

# 过表达 PRDM14 非小细胞肺癌肿瘤细胞株的构建

卢亚楠, 刘思琰, 麻雨晴, 刘梦琪, 齐悦

(北京城市学院生物医药学部, 北京 100094)

**摘要:** 本研究通过克隆人的 *PRDM14* 基因, 构建过表达 *PRDM14* 的真核表达载体, 转染 NCI-H1975 细胞后得到高表达 *PRDM14* 的非小细胞肺癌细胞株。以人胚胎干细胞 cDNA 为模板, PCR 扩增 *PRDM14* 基因编码序列, 将其插入 pcDNA3.1 真核表达载体, 经双酶切和测序验证后, 将重组质粒转染到 NCI-H1975 肺癌细胞中, 采用 Western blot 检测目的蛋白表达情况。结果表明, pcDNA3.1-prdm14 重组载体构建成功, 且目的蛋白能够在 NCI-H1975 细胞中正常表达。构建的过表达 *PRDM14* 非小细胞肺癌细胞株可以为后续研究该基因对非小细胞肺癌的调控作用及非小细胞肺癌的靶向药物研究等提供实验材料。

**关键词:** PRDM14; 真核表达载体; 非小细胞肺癌

**中图分类号:** Q784 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4513(2022)-05-31-05

## 引言

伴随着全球老龄化加剧, 世界范围内患病患者的人数不断上升, 中国作为人口大国, 无论是患病患者还是因癌症死亡的人数都不容小觑。在世界卫生组织国际癌症研究机构发布的 2020 年全球最新癌症负担数据中显示, 2020 年全球癌症死亡病例 996 万例, 其中中国新发癌症 457 万人, 将近占全球的 24%, 而肺癌死亡人数就高达 180 万例, 远超其他癌症类型, 位居因癌症死亡人数第一。

根据病理组织不同, 肺癌具体分为非小细胞癌和小细胞癌两种。非小细胞肺癌约占所有肺癌的 85%, 主要分为腺癌、鳞状细胞癌和大细胞癌三个亚型。与小细胞癌相比, 非小细胞肺癌细胞生长分裂较慢, 扩散转移相对较晚, 因此约 75% 的患者发现时已处于中晚期, 5 年

生存率不足 30%, 手术治疗效果不理想, 只能进行以化疗为主的综合性治疗。

*PRDM14* (正性调节区锌指蛋白 14) 作为转录调节因子, 是 *PRDM* 家族成员之一, 与细胞的增殖调控、分化、发育等密切相关, 癌症以及一些其他疾病也与该因子异常有关。*PRDM14* 在 N 端有 1 个 PR 结构域, 在 C 端有 6 个锌指结构, 含有的 SET 蛋白结构域已经检测到组蛋白甲基转移酶活性, 可以对靶基因的染色质结构进行直接修饰, 以此来实现基因的表达调控。

刘冰冰等研究发现随着肺癌细胞分化程度的升高, *PRDM14* 的表达水平也升高, 推测 *PRDM14* 在肺癌发生的早期起作用, 促进细胞增殖, 在肺癌发展到严重分化不良时, 可能由于 PR 域的 CpG 岛甲基化使 mRNA 表达受到抑制, 引起了其蛋白表达的下调。另利用 Western

**收稿日期:** 2022 年 02 月 10 日

**作者简介:** 卢亚楠 (1990-), 女, 河南济源人, 讲师, 博士, 主要研究方向: 肿瘤分子标记物、食品营养与健康。

**基金项目:** 2021 年北京城市学院“城市新星计划”训练项目—过表达 *PRDM14* 的非小细胞肺癌肿瘤细胞筛选 (202111418016)。

blot 技术检测了 PRDM14 蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达情况,结果显示 PRDM14 蛋白的表达在肺鳞癌和腺癌中均高于癌旁正常组织,而且与非小细胞癌的分化程度有关,这提示我们 PRDM14 在非小细胞肺癌早期起着重要的作用。

Zhang 等分析了手术切除后非小细胞肺癌病人 PRDM14 的表达水平与其预后的相关性。结果显示 PRDM14 在 35.65% 的原发肿瘤样本中表达增加,在 39.68% 的伴有淋巴转移的样本中表达增加,PRDM14 表达的增加与肿瘤细胞的分化程度显著相关 ( $p = 0.008$ )。因此,PRDM14 可能成为非小细胞肺癌不良预后的潜在生物标志物。

近年来精准医疗的快速发展,基因靶向治疗是近年来新兴的治疗手段,具有特异性识别肿瘤细胞并杀死肿瘤细胞,对其他细胞危害较少等优点。靶向治疗为非小细胞癌提供了新的治疗手段,PRDM14 基因有望成为非小细胞肺癌早期诊断和预后评估的新靶点。

本研究通过克隆人 PRDM14 基因,构建真核过表达载体后转染人的非小细胞肺癌细胞,得到高表达 PRDM14 的非小细胞肺癌细胞株,该细胞株不仅可以为后续非小细胞肺癌发生、发展以及耐药性等相关研究提供实验材料,还可以为后续靶向治疗非小细胞肺癌的方法探寻奠定理论基础。

## 一、实验材料

### (一) 实验耗材

NCI-H1975 肺腺癌细胞系为中药与生物技术实验教学中心细胞房冻存;无水乙醇、异丙醇、 $1 \times$  TBE 缓冲液、 $6 \times$  Loading Buffer、氨苄抗生素、LB 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶、二甲亚砜、 $1 \times$  TBST、脱脂奶粉、pcDNA3.1 质粒和大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞等均购自北京爱科嘉生物科技有限公司。其余实验耗材见表 1 所列。

### (二) 主要仪器

实验使用的主要仪器见表 2。

表 1 实验耗材及品牌

名称	品牌
快速内切酶 <i>EcoR</i> I、 <i>Xba</i> I	NEB
$2 \times$ Taq PCR mix	TIANGEN
$2 \times$ Super Pfx Master mix	康为世纪
GAPDH Mouse Monoclonal Antibody	碧云天
Anti-mouse IgG-HRP	碧云天
Anti-PRDM14	Abcam
彩虹 180 光谱蛋白 marker	Solarbio
D2000 DNA Ladder Marker	Solarbio
Supercoiled DNA Ladder Marker	NEB
Lipo8000™ 转染试剂	碧云天
凝胶 DNA 小量回收试剂盒	Magen
去内毒素质粒大提试剂盒	Magen
同源重组试剂盒	诺维赞
SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒	康为世纪

表 2 主要仪器及型号

仪器名称	厂家	型号
二氧化碳细	松下健康医疗	MCO-5A
胞培养箱	机械株式会社	—
荧光显微镜	北京浩海科仪	SHB-III
赛洛捷克台式离心机	上海珂淮	DMO42
Sigma 台式离心机	上海天放	3K15
凝胶成像仪	上海天能	Tanon 1600
PCR 仪	北京原平皓	SBT 9610-230V
显影仪	北京原平皓	Tanon 5200
紫外分光光度计	上海光谱仪器厂	2000 UV

## 二、实验方法

### (一) PRDM14 引物设计和基因扩增

在 NCBI 上获取人的 PRDM14 cDNA 序列 (基因序列号: NM\_024504.4), 采用 Primer Premier 5.0 设计上游引物 F: 5' - TAGTC-CAGTGTGGTGAATTCATGGCTCTACCCCG - 3' 和下游引物 R: 5' - ACGGGCCCTCTAGEAC-TAGTACTCTTCATGAACTTCATGTGG - 3', 引物中含有载体同源臂序列。以人的胚胎干细胞



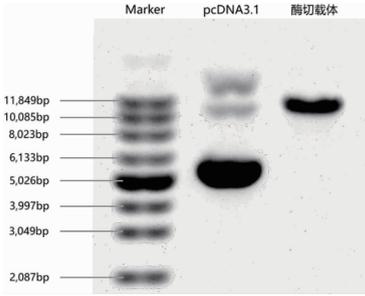


图3 载体双酶切电泳鉴定

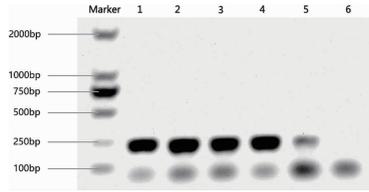


图4 菌液 PCR 鉴定阳性克隆

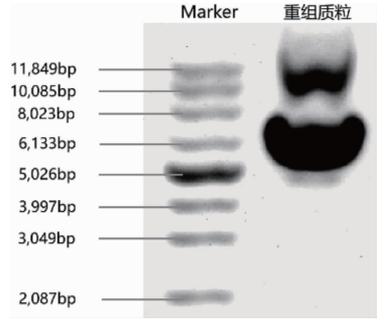


图5 重组质粒电泳结果

致，说明酶切完全，可以进行胶回收，得到高浓度的线性化载体片段。

### (三) 过表达 PRDM14 真核表达载体的构建

通过酶切连接的方式将 PRDM14 片段重组到 pcDNA3.1 载体的多克隆位点，构建成 pcDNA3.1 - prdm14 的重组载体。经过大肠杆菌扩增和菌液 PCR 鉴定，PCR 鉴定时选择载体上的 T7 位点设计上游引物，在插入目的基因片段上设计下游引物，琼脂糖凝胶电泳鉴定结果如图 4 所示，在 217 bp 处有单一条带的即为阳性克隆，阳性克隆菌测序鉴定正确。提取重组质粒，琼脂糖凝胶电泳鉴定结果如图 5 所示，条带位置在 7100 bp 左右，与预期一致，测定其浓度为 596 ng/μL。

### (四) Western Blot 检测 PRDM14 蛋白的表达

复苏培养人非小细胞肺癌细胞系 NCI - H1975，待细胞生长至汇合度达 70%，以合适密度接种至细胞培养板。利用去内毒素质粒大提试剂盒回收重组质粒 pcDNA3.1 - prdm14，采用脂质体转染重组质粒至细胞，72 h 后收集细胞并提取蛋白质。经过 Western Blot 检测分析，目的蛋白 PRDM14 在 NCI - H1975 细胞中可以正常表达（如图 6 所示）。

## 结语

肺癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一，发病率和死亡率长居前列，同时，还有着早期诊断率低、化疗副作用大、五年生存率较低等问题。近年来，探索非小细胞肺癌的靶向治疗方



图6 Western Blot 检测 PRDM14 蛋白的表达

式主要有两个方向：一个是为没有特异性药物的已知驱动基因寻找到有效的靶向药物，另一个是寻找新的驱动基因。越来越多的非小细胞肺癌晚期病人接受了靶向药物的治疗，明显延长了无进展生存期和总生存期，提高了生活质量。目前，已有研究表明 PRDM14 与非小细胞肺癌的发生发展有着密不可分的联系，进一步探究 PRDM14 对非小细胞肺癌细胞增殖过程的影响，有望为寻找新的治疗靶点提供理论依据。

本研究以人胚胎干细胞 cDNA 为模板，PCR 扩增 PRDM14 基因片段，将其连接至 pcDNA3.1 载体并转染至非小细胞肺癌细胞 NCI - H1975 中，成功构建了过表达 PRDM14 的非小细胞肺癌细胞株，为后续深入研究该基因的功能提供了重要的实验材料。

### 参考文献：

- [1] 刘宗超, 李哲轩, 张阳, 等. 2020 全球癌症统计报告解读 [J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7 (2): 1 - 13.
- [2] 胥瑞婷, 马音, 朱炜炜. 中医药联合靶向药物治疗非小细胞肺癌的研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 12 (3): 1359 - 1363.
- [3] 韩玉栋, 林强. 正性调节区锌指蛋白 14 的研究进

- 展 [J]. 中国肺癌杂志, 2016, 19 (2): 93 - 97.
- [4] 卢亚楠. PRDM14 对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖和凋亡的影响及作用机制研究 [D]. 中国农业大学, 2017: 86 - 100.
- [5] 刘冰冰, 张四洋, 惠林萍, 等. PRDM14 在非小细胞肺癌中的表达及其与临床病理因素的关系 [J]. 中国肺癌杂志, 2010, 13 (9): 867 - 872.
- [6] Zhang T, Meng L, Dong W, et al. High expression of PRDM14 correlates with cell differentiation and is a novel prognostic marker in resected non-small cell lung cancer [J]. Med Oncol, 2013, 30 (3): 605 - 611.
- [7] 赵欣瑶, 于丽波, 葛鲁倩, 等. PRDM14 在肿瘤中的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26 (3): 482 - 485.
- [8] 靳贺, 杨黎, 李春刚. 非小细胞肺癌靶向治疗研究进展 [J]. 解放军医药杂志, 2020, 32 (7): 105 - 111.

## Construction of Non - small Cell Lung Cancer Cells Overexpressing PRDM14

LU Yanan, LIU Silong, MA Yuqing, LIU Mengqi, QI Yue  
(Beijing City University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** In this study, we cloned human *PRDM14* gene, constructed an eukaryotic expression vector overexpressing PRDM14, and transfected NCI-H1975 cells to obtain a non-small cell lung cancer cell line with high expression of PRDM14. Using human embryonic stem cell cDNA as template, the coding sequence of *PRDM14* gene was amplified by PCR and inserted into pcDNA3. 1 eukaryotic expression vector, after double enzyme digestion and sequencing verification, the recombinant plasmid was transferred into NCI-H1975 lung cancer cells, and the expression of the target protein was detected by Western blot. The results showed that the recombinant vector pcDNA3. 1-prdm14 was successfully constructed, and the target protein could be normally expressed in NCI-H1975 cells. The construction of non-small cell lung cancer cells overexpressing PRDM14 can provide experimental materials for the follow-up study, such as the regulatory effect of the gene on non-small cell lung cancer and the research of targeted drugs for non-small cell lung cancer.

**Keywords:** PRDM14; Eukaryotic expression vector; small cell lung cancer

(责任编辑: 田荣荣)